

基于单细胞转录组学探究LNPEP在胆管癌顺铂耐药中的作用

王玺尧¹, 马 湘^{2*}

¹青岛大学第一临床医学院, 山东 青岛

²青岛大学附属医院肝胆胰外科, 山东 青岛

收稿日期: 2026年3月21日; 录用日期: 2026年4月16日; 发布日期: 2026年4月22日

摘 要

背景: 胆管癌(CCA)是一种恶性肿瘤, 顺铂等化疗药物的耐药性显著影响治疗效果, 其机制尚未完全阐明。本研究旨在通过分析TCGA-CHOL数据集和单细胞RNA测序数据, 揭示铂类耐药相关的分子特征, 重点探索LNPEP (Leucyl and Cystinyl Aminopeptidase)在胆管癌铂类耐药中的潜在作用, 并探讨其在耐药表型形成和肿瘤微环境调控中的作用。**方法:** 基于TCGA-CHOL转录组数据, 进行差异表达分析, 筛选出铂类耐药相关的差异表达基因(PR-DEGs)。然后, 通过Cox比例风险回归和LASSO回归构建铂类耐药相关的预后模型。随后, 结合单细胞RNA测序数据, 分析LNPEP在不同细胞亚群中的表达特征, 并通过细胞通讯分析揭示LNPEP在耐药亚群中的潜在作用机制。**结果:** 通过联合分析TCGA-CHOL转录组数据和单细胞RNA测序数据, 我们发现LNPEP是胆管癌铂类耐药的关键基因, 并在单细胞数据中筛选出相关的耐药亚群(CCA-R)。该亚群与肿瘤微环境中的成纤维细胞、巨噬细胞和内皮细胞之间存在显著的细胞间通讯。进一步的NicheNet分析表明, LNPEP可能通过ECM重塑、炎症因子和生长因子相关信号通路维持耐药表型。**结论:** 本研究系统解析了胆管癌铂类耐药的分子特征, 发现LNPEP在耐药表型的形成中可能发挥关键作用。通过单细胞异质性与肿瘤微环境的互作分析, 本研究为胆管癌铂类耐药的机制研究提供了新的视角, 并为精准治疗和耐药预测提供了新的分子标志物。LNPEP可能成为胆管癌铂类耐药的新靶点, 为未来的联合干预治疗提供理论基础。

关键词

胆管癌, LNPEP, 肿瘤微环境, 顺铂耐药

Investigating the Role of LNPEP in Cisplatin Resistance in Cholangiocarcinoma Based on Single-Cell Transcriptomics

*通讯作者。

文章引用: 王玺尧, 马湘. 基于单细胞转录组学探究 LNPEP 在胆管癌顺铂耐药中的作用[J]. 临床医学进展, 2026, 16(4): 4169-4183. DOI: 10.12677/acm.2026.1641686

Xiyao Wang¹, Xiang Ma^{2*}

¹First Clinical Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: March 21, 2026; accepted: April 16, 2026; published: April 22, 2026

Abstract

Background: Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant tumor, and the resistance to chemotherapy drugs such as cisplatin significantly affects treatment outcomes. The mechanism of this resistance is not fully understood. This study aims to reveal the molecular characteristics associated with platinum resistance by analyzing the TCGA-CHOL dataset and single-cell RNA sequencing data, focusing on exploring the potential role of LNPEP (Leucyl and Cystinyl Aminopeptidase) in cisplatin resistance in CCA, and investigating its role in the formation of resistance phenotypes and regulation of the tumor microenvironment. **Methods:** Differential expression analysis was conducted based on the TCGA-CHOL transcriptomic data to identify platinum resistance-related differentially expressed genes (PR-DEGs). Subsequently, Cox proportional hazards regression and LASSO regression were applied to construct a platinum resistance-related prognostic model. Single-cell RNA sequencing data were then combined to analyze the expression characteristics of LNPEP in different cell subpopulations, and cell communication analysis was performed to uncover the potential mechanisms of LNPEP in resistance subpopulations. **Results:** By integrating the TCGA-CHOL transcriptomic data and single-cell RNA sequencing data, we identified LNPEP as a key gene involved in cisplatin resistance in CCA. We also identified related resistance subpopulations (CCA-R) in single-cell data, which exhibited significant cell-to-cell communication with fibroblasts, macrophages, and endothelial cells in the tumor microenvironment. Further NicheNet analysis suggested that LNPEP may maintain the resistance phenotype through ECM remodeling, inflammatory factors, and growth factor-related signaling pathways. **Conclusion:** This study systematically analyzes the molecular characteristics of platinum resistance in CCA and reveals that LNPEP may play a crucial role in the formation of the resistance phenotype. By analyzing the single-cell heterogeneity and tumor microenvironment interactions, this study provides new insights into the mechanisms of platinum resistance in CCA and identifies new molecular biomarkers for precision treatment and resistance prediction. LNPEP may become a novel target for platinum resistance in CCA and provide a theoretical basis for future combination therapies.

Keywords

Cholangiocarcinoma, LNPEP, Tumor Microenvironment, Cisplatin Resistance

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胆管癌(Cholangiocarcinoma, CCA)是一种来源于胆管上皮的恶性肿瘤,近年来其发病率逐渐增加[1]。尽管手术切除和化疗是常见的治疗手段,但由于胆管癌的早期症状不明显且多为晚期发现,导致治疗效果较差,五年生存率较低。化疗仍然是晚期胆管癌患者主要的治疗方法之一,然而,化疗耐药性极大地

限制了治疗效果的提升。顺铂(Cisplatin)作为常用的铂类化疗药物,已广泛应用于胆管癌治疗,但其耐药性的出现使得患者预后仍不乐观[2][3]。因此,铂类耐药的机制及其预测生物标志物的研究成为当前癌症治疗研究的热点之一。

尽管已有大量关于铂类耐药性的研究,但其确切机制尚未完全明确。现有的研究主要集中在肿瘤细胞内的基因突变、DNA修复机制、药物外排泵等方面[4],然而,肿瘤微环境对耐药性的影响仍未得到充分重视。近年来的研究表明,肿瘤细胞与肿瘤微环境中的免疫细胞、成纤维细胞及基质成分之间的相互作用在耐药机制中扮演着重要角色,尤其是在耐药表型的形成和维持过程中[5]-[7]。因此,探索肿瘤微环境与化疗耐药之间的关系,为开发新的治疗策略提供了新的方向。

LNPEP (Leucyl and Cystinyl Aminopeptidase)是一种与蛋白质代谢、肽段降解相关的氨肽酶,已知在多种类型的肿瘤中表达异常,并与肿瘤的生物行为、预后相关。近期的研究表明[8],LNPEP可能不仅是一个代谢酶,还可能通过调节肿瘤微环境的免疫细胞浸润、基质重塑等过程,间接影响肿瘤的进展和耐药性。然而,关于LNPEP在胆管癌中的作用机制,尤其是在铂类耐药中的潜在作用,目前尚缺乏系统性的研究。

本研究旨在通过TCGA-CHOL转录组数据和单细胞RNA测序数据构建铂类耐药相关的预后模型,并在此基础上深入探索LNPEP在胆管癌铂类耐药性中的作用。我们通过分析胆管癌肿瘤细胞与肿瘤微环境的相互作用,揭示LNPEP在耐药亚群中的表达特征,并探讨其可能通过调控免疫微环境、细胞外基质(ECM)相关信号,影响耐药表型的形成和维持。

2. 材料与方法

2.1. 数据获取与处理

2.1.1. TCGA 转录组数据与临床信息

本研究使用的胆管癌转录组数据及临床信息来自癌症基因组图谱(TCGA)中的TCGA-CHOL项目,共纳入44个样本(35例肿瘤组织,9例正常组织)。我们下载了原始基因表达计数矩阵和临床数据,并整理了总体生存期(OS),定义为从确诊至死亡或未次随访的时间。

2.1.2. 铂类耐药相关基因集

铂类耐药相关基因集(platinum resistance-related genes, PRGs)来源于铂类耐药基因数据库PTRC-DDR(<https://ptrc-ddr.cptac-data-view.org/>)。

2.1.3. 单细胞 RNA 测序数据

单细胞RNA测序数据来源于GEO数据库中的GSE138709数据集,包含8个样本(4例初治肝内胆管癌,1例复发性肝内胆管癌,3例癌旁正常组织),使用10× Genomics平台测序,获得约56,871个单细胞转录组数据。

2.1.4. 免疫组化数据

肝内胆管癌组织及正常组织的免疫组化(immunohistochemistry, IHC)图像来源于人类蛋白质图谱(The Human Protein Atlas, HPA, <https://www.proteinatlas.org/>)数据库,用于验证关键基因在蛋白水平的表达差异。

2.2. Bulk 转录组数据分析

2.2.1. 差异表达分析

使用TPM标准化的mRNA表达矩阵进行差异表达分析,去除低表达基因。采用Wilcoxon秩和检验比较肿瘤组与正常组的表达差异,并使用Benjamini-Hochberg方法进行多重检验校正,筛选出 $|\log_{2}FC| > 1$

且 $FDR < 0.05$ 的差异表达基因(DEGs)。

2.2.2. 预后相关基因筛选与风险模型构建

将 DEGs 与 PRGs 交集, 得到铂类耐药相关差异表达基因(PR-DEGs)。使用单因素 Cox 比例风险回归分析筛选与患者预后显著相关的基因。随后, 使用 LASSO-Cox 回归分析, 结合 10 折交叉验证确定最佳惩罚参数 λ_{\min} , 构建风险评分模型:

$$\text{Risk Score} = \sum_{i=1}^n (\text{Coef}_i \times \text{Expr}_i)$$

其中, Coef_i 为基因的 LASSO 回归系数, Expr_i 为该基因的表达量。

2.2.3. 预后模型的验证与评估

根据风险评分中位数将患者分为高风险组和低风险组, 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线并进行 Log-rank 检验。使用 timeROC 包评估 1 年、3 年、5 年生存结局的 AUC。

2.3. 单细胞 RNA 测序数据分析

2.3.1. 质量控制与过滤

使用 Seurat 包(version 5.3.0)对 scRNA-seq 数据进行分析。最小检测基因数为 300、最小细胞数为 3。设定质控标准如下: nFeature_RNA 为 500~4500, nCount_RNA 为 1500~22,000, 线粒体基因比例(percent.mt) $< 20\%$, 血红蛋白基因比例(percent.HB) $< 1\%$, 以去除低质量细胞、潜在双细胞及红细胞污染。

2.3.2. 双细胞检测与去除

采用 DoubletFinder 包(version 2.0.4)识别并去除双细胞。通过参数扫描(paramSweep)确定最优参数 pK, 并将预期双细胞形成率设定为 7%。所有被判定为双细胞的细胞均予以剔除。

2.3.3. 数据标准化与细胞周期效应去除

采用 LogNormalize 方法对表达矩阵进行标准化, 并筛选前 2000 个高变基因。利用 Seurat 内置细胞周期标志基因计算每个细胞的 S 期和 G2/M 期评分, 消除细胞周期效应对基因表达的干扰。

2.3.4. 降维、批次效应去除与细胞聚类

通过主成分分析(PCA)降维, 使用 Harmony 算法消除批次效应, 并进行聚类分析。使用 clustree 包评估聚类稳定性, 选定分辨率为 0.8。

2.3.5. 细胞类型注释

依据各聚类特异表达基因及文献报道的经典标志基因进行细胞类型注释。

2.3.6. 染色体拷贝数变异推断与恶性细胞鉴定

使用 CopyKAT 算法对染色体拷贝数变异(CNV)进行推断, 将非整倍体上皮细胞定义为胆管癌细胞, 二倍体上皮细胞定义为正常胆管上皮细胞。随后利用 Seurat 的 FindMarkers 函数对两者进行差异表达分析, 采用 Wilcoxon 秩和检验, 筛选标准为 $\log_{2}FC > 0.25$ 、 $\text{min.pct} = 0.1$ 且 $P < 0.05$ 。

2.4. LNPEP 基因的表达验证

2.4.1. TCGA-CHOL 中的差异表达验证

为验证核心基因 LNPEP 在胆管癌组织中的表达异常, 提取 TCGA-CHOL 队列中的 TPM 表达数据, 采用 ggplot2 包(version 4.0.1)绘制箱线图, 并使用 Wilcoxon 秩和检验评估肿瘤组与正常组之间的表达差异($P < 0.05$)。

2.4.2. TCGA-CHOL 药物敏感性预测

采用 oncoPredict 包(version 1.2)进行药物敏感性分析。基于 GDSC2 数据库的表达谱及药物反应数据构建岭回归预测模型,并以 TCGA-CHOL 样本及后续单细胞亚群表达数据作为测试集,预测顺铂(cisplatin)的半数抑制浓度(IC50)。

2.4.3. 恶性亚群重聚类与耐药机制探究

提取恶性胆管癌细胞后构建独立子集,重新进行标准化、高变基因筛选、细胞周期效应校正、PCA 降维及 Harmony 去批次处理。结合 clustree 评估结果,选择分辨率 0.8 对恶性细胞进行进一步亚群划分。

为探讨 LNPEP 表达异质性与化疗耐药的潜在关联,采用基于聚类的分组策略以降低单细胞数据稀疏性带来的偏倚。综合各亚群 LNPEP 的平均表达 Z-score 和表达阳性细胞比例进行分组,定义阈值为 Z-score > 0.2 且非零表达比例 > 30%。

2.4.4. 细胞通讯分析

使用 CellChat 包分析肿瘤微环境与 CCA-R 之间的细胞间通讯,识别配体-受体相互作用,并计算相互作用强度。

2.4.5. 基于 NicheNet 的配体-靶基因调控网络预测

采用 NicheNet 构建配体-受体-靶基因调控网络,以进一步解析肿瘤微环境来源配体对 CCA-R 耐药相关基因表达的潜在调控机制。

3. 结果

3.1. 基于 TCGA 队列的铂类耐药相关预后模型的构建与验证

为筛选与铂类治疗耐受相关的潜在关键分子,首先基于 TCGA-CHOL 队列转录组数据开展差异表达分析,共鉴定出 11,480 个差异表达基因(DEGs)。与此同时,从 PTRC-DDR 数据库整理获得 912 个已知铂类耐药相关基因(PRGs)。将两类基因集进行交叉比对后,共获得 675 个铂类耐药相关差异表达基因(PR-DEGs),并以此作为后续预后分析的候选基因集(图 1(A))。

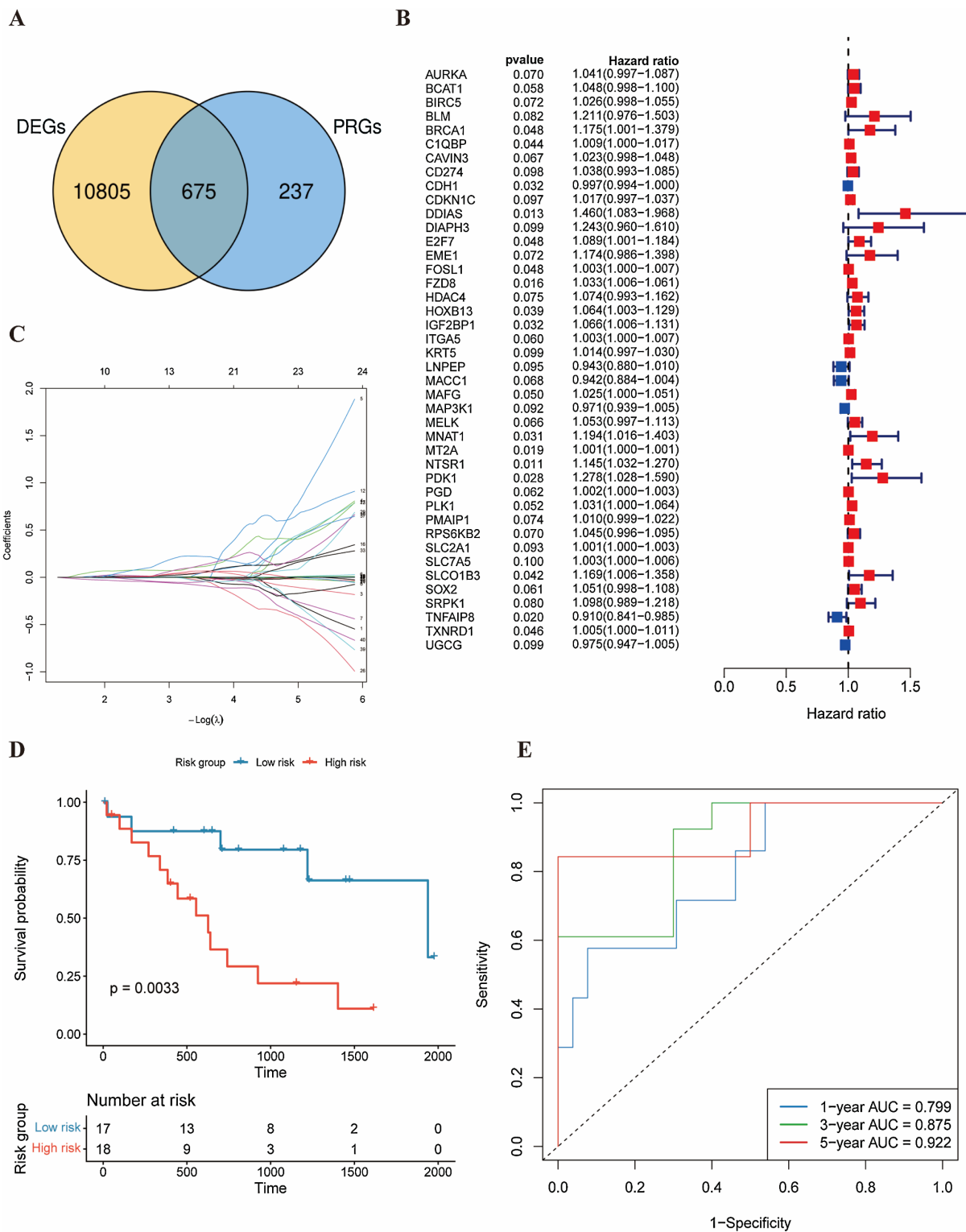
在此基础上,以总体生存期(OS)为临床终点,采用单因素 Cox 比例风险回归对 PR-DEGs 进行生存相关性筛选,最终获得 42 个与患者预后显著相关的候选基因(图 1(B))。

为进一步压缩变量数量并提高模型稳健性,将上述候选基因纳入 LASSO-Cox 回归分析。图 1(C)显示了模型系数随惩罚参数变化的收缩过程及最优参数的筛选结果。共保留 6 个非零系数基因,分别为 BRCA1、CDH1、LNPEP、MNAT1、PDK1 和 TNFAIP8,并据此建立风险评分模型: $\text{Risk score} = 0.0117 * \text{BRCA1} + -0.0015 * \text{CDH1} + -0.0026 * \text{LNPEP} + 0.053 * \text{MNAT1} + 4e-04 * \text{PDK1} + -0.0248 * \text{TNFAIP8}$ 。

依据风险评分中位数将患者划分为高风险组和低风险组。Kaplan-Meier 生存曲线分析表明,高风险组患者的总体生存水平明显低于低风险组,说明该模型能够有效区分不同预后亚群(图 1(D))。进一步通过时间依赖性 ROC 曲线评价模型的预测效能。结果显示,该模型对 1 年、3 年和 5 年生存结局的 AUC 分别为 0.799、0.875 和 0.922(图 1(E)),提示所构建的铂类耐药相关预后模型对胆管癌患者结局具有较好的判别能力和预测价值。

3.2. CCA 单细胞图谱构建与恶性细胞鉴定

为刻画 CCA 在单细胞层面的异质性特征,本研究对 GSE138709 队列进行了整合分析。经质控后,选取 2000 个高变基因用于后续降维。依据主成分分析的方差解释情况,保留前 25 个主成分,并进一步采用 Harmony 方法校正样本间批次差异。综合聚类稳定性与生物学可解释性,最终确定分辨率为 0.8,



(A) 从 TCGA-CHOL 队列中筛选出的铂类耐药相关差异表达基因(PR-DEGs)。(B) 单因素 Cox 回归分析筛选出 42 个与患者预后显著相关的候选基因。(C) LASSO-Cox 回归分析。(D) Kaplan-Meier 生存曲线分析, 显示高风险组患者的总体生存明显低于低风险组。(E) 通过时间依赖性 ROC 曲线评估模型的预测效能。

Figure 1. Platinum resistance-related prognostic model in the TCGA-CHOL cohort

图 1. 基于 TCGA-CHOL 队列构建铂类耐药相关预后模型

共获得 23 个细胞簇(Cluster 0~22, 图 2(A))。

结合各细胞簇的标志基因表达特征(图 2(B)), 对细胞类型进行注释, 主要包括上皮细胞(KRT19、EPCAM、KRT18)、T 细胞(CD2、CD3D、CD3E)、巨噬细胞(CD14、CD68、CD163)、成纤维细胞(COL1A1、COL3A1、NDUFA4L2)、内皮细胞(ENG、VWF、CD34)、B 细胞(MS4A1、CD79A)、肝细胞(ALB、TTR、APOE)及树突状细胞(CLEC9A、CD1C)(图 2(C))。图 2(E)展示了各类细胞的代表性标志基因表达模式。

进一步比较不同样本的细胞组成可见, 不同来源样本间细胞构成存在明显差异; 肿瘤组织样本(如 18T 和 20T)中上皮细胞及免疫细胞, 尤其是 T 细胞和巨噬细胞, 占据较高比例。提示胆管癌具有显著的细胞异质性及复杂的肿瘤微环境特征(图 2(D))。

3.3. CopyKAT 鉴定恶性上皮细胞

为在单细胞层面准确识别恶性胆管癌细胞, 本研究采用 CopyKAT 算法对上皮细胞进行染色体拷贝数变异(CNV)推断。结果显示, 依据基因组拷贝数改变特征, 上皮细胞可明确分为非整倍体(aneuploid)和二倍体(diploid)两类。结合前述细胞注释结果, 将非整倍体上皮细胞界定为恶性胆管癌细胞, 二倍体上皮细胞界定为正常胆管上皮细胞(图 3(A))。

在此基础上, 对恶性胆管癌细胞与正常胆管上皮细胞进行了差异表达分析。随后, 将单细胞层面获得的差异基因与 TCGA bulk 转录组中经 LASSO 回归筛选得到的 6 个核心预后基因(BRCA1、CDH1、LNPEP、MNAT1、PDK1 和 TNFAIP8)进行交集分析。结果表明, LNPEP 和 TNFAIP8 在单细胞水平同样呈现显著差异上调(图 3(B))。根据单细胞水平的恶性特异性表达特征, 我们最终选择 LNPEP 作为后续探究胆管癌铂类耐药机制的核心靶基因。

3.4. LNPEP 的表达验证及其驱动胆管癌铂类耐药的机制解析

3.4.1. LNPEP 表达验证

我们分析了 TCGA-CHOL 队列的转录组数据, 结果显示, LNPEP 在肿瘤组织中的表达水平显著高于癌旁正常组织(图 4(A))。

为了在蛋白水平进一步验证核心基因 LNPEP 在胆管癌中的表达特征, 我们从人类蛋白质图谱(HPA)数据库中提取并分析了胆管癌组织与肝组织的免疫组化(IHC)染色图像。结果显示, 在正常肝组织中, LNPEP 的染色强度极低, 基本呈现阴性或弱阳性反应, 组织切片背景清晰。相比之下, 在胆管癌组织样本中, LNPEP 表现出显著的强阳性染色(图 4(B))。

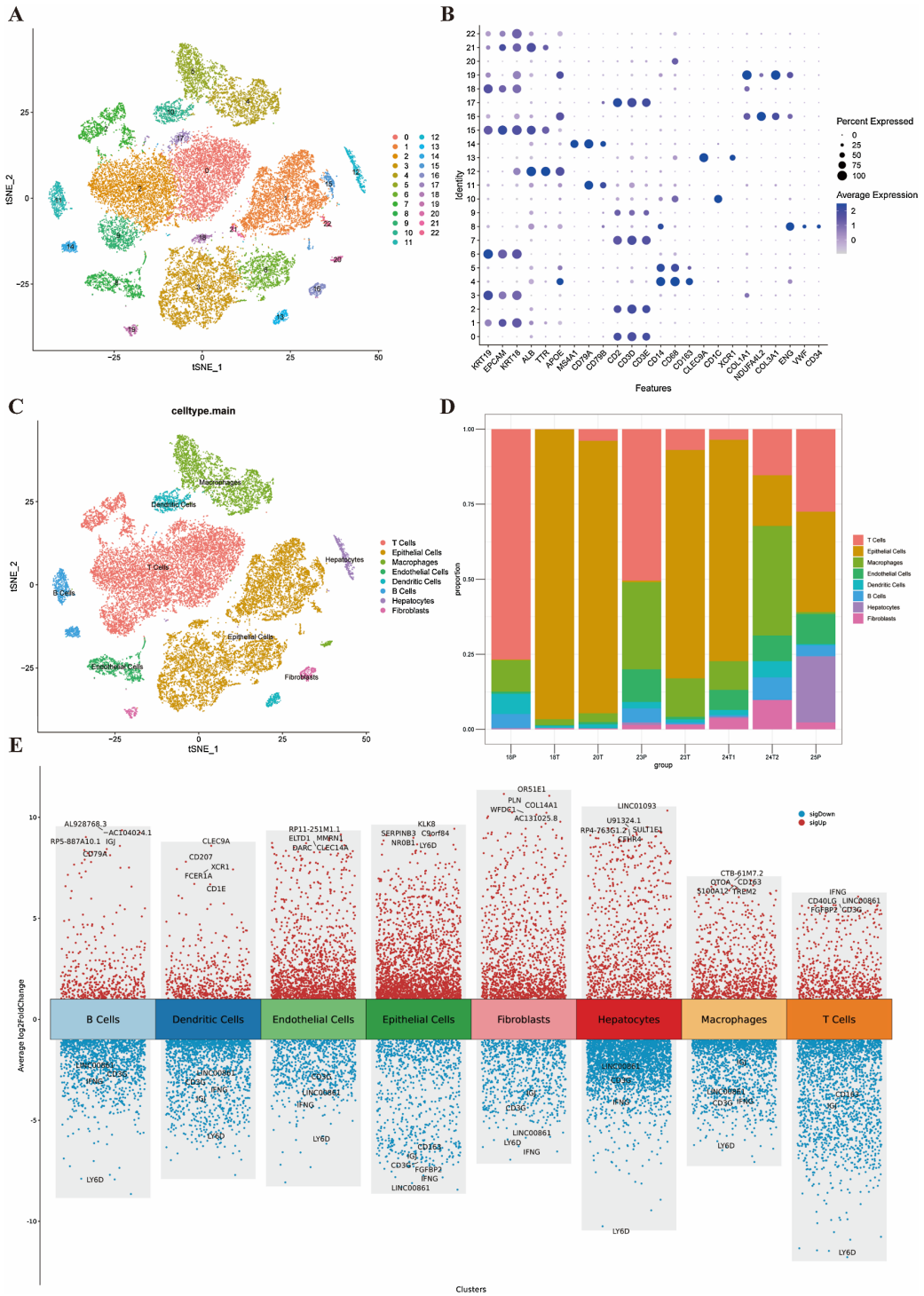
3.4.2. LNPEP 在 TCGA-CHOL 队列中顺铂耐药验证

为了评估 LNPEP 表达水平与临床化疗反应的关系, 我们根据 LNPEP 的表达量将 TCGA-CHOL 队列中的样本分为高、低表达组, 利用 oncoPredict 算法在两组样本中预测了多种化疗药物的敏感性。分析结果证实, LNPEP 高表达组对顺铂(Cisplatin)的半数抑制浓度(IC50)显著高于低表达组(图 5), 这表明 LNPEP 的高表达与胆管癌的铂类药物耐药性密切相关。

3.4.3. 基于 LNPEP 异质性表达锁定铂类耐药恶性亚群

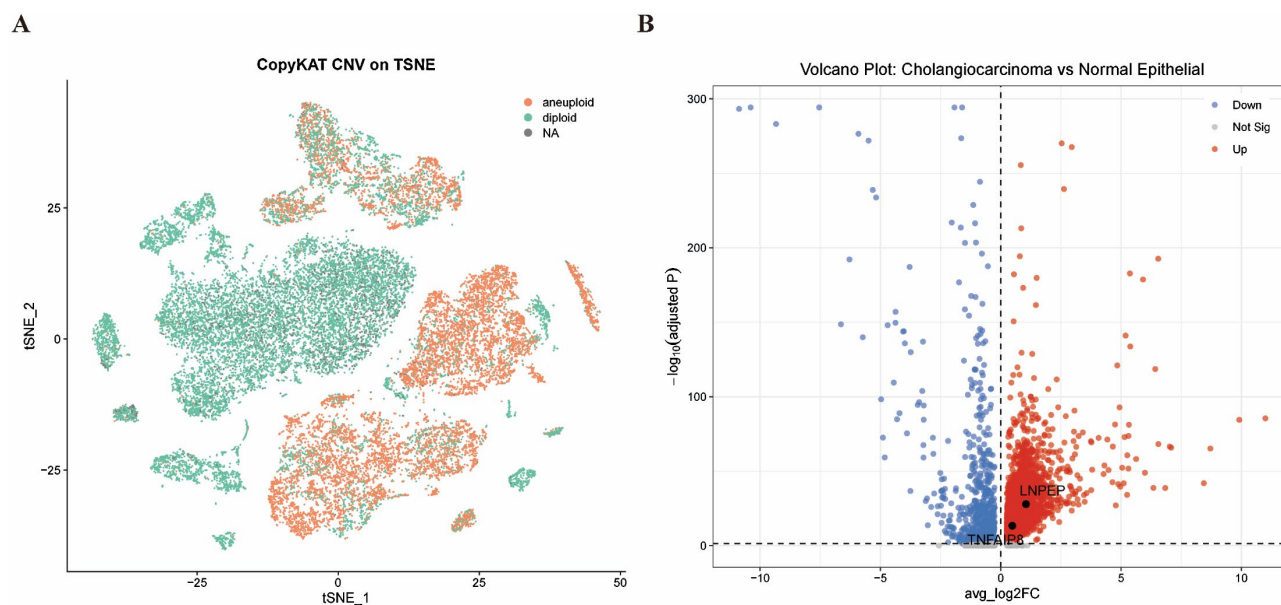
为了在单细胞分辨率下解析胆管癌细胞内部的耐药异质性, 我们提取了所有恶性胆管癌细胞进行重聚类分析。经过降维与聚类, 恶性细胞被进一步划分为 15 个精细亚群(Clusters 0~14, 图 6(A))。图 6(B)展示了 LNPEP 在胆管癌细胞中的表达情况。

依据预设的筛选标准, 我们综合 LNPEP 的表达强度与广度(图 6(C)), 识别出 LNPEP 显著高表达的细胞簇 3、6、7 和 13。我们将其定义为“LNPEP 相关的顺铂耐药亚群(CCA-R)”, 而其余低表达或



(A) 通过对 GSE138709 队列进行主成分分析和 Harmony 批次效应校正, 最终确定分辨率为 0.8, 获得 23 个细胞簇 (Cluster 0~22)。(B) 依据标志基因表达特征, 注释了主要细胞类型, 包括上皮细胞、T 细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、B 细胞、肝细胞和树突状细胞。(C) 各细胞类型的代表性标志基因表达模式。(D) 不同来源样本的细胞组成分析, 肿瘤样本中上皮细胞及免疫细胞占比高, 提示胆管癌的显著细胞异质性。(E) 不同细胞类型的标志基因表达模式展示。

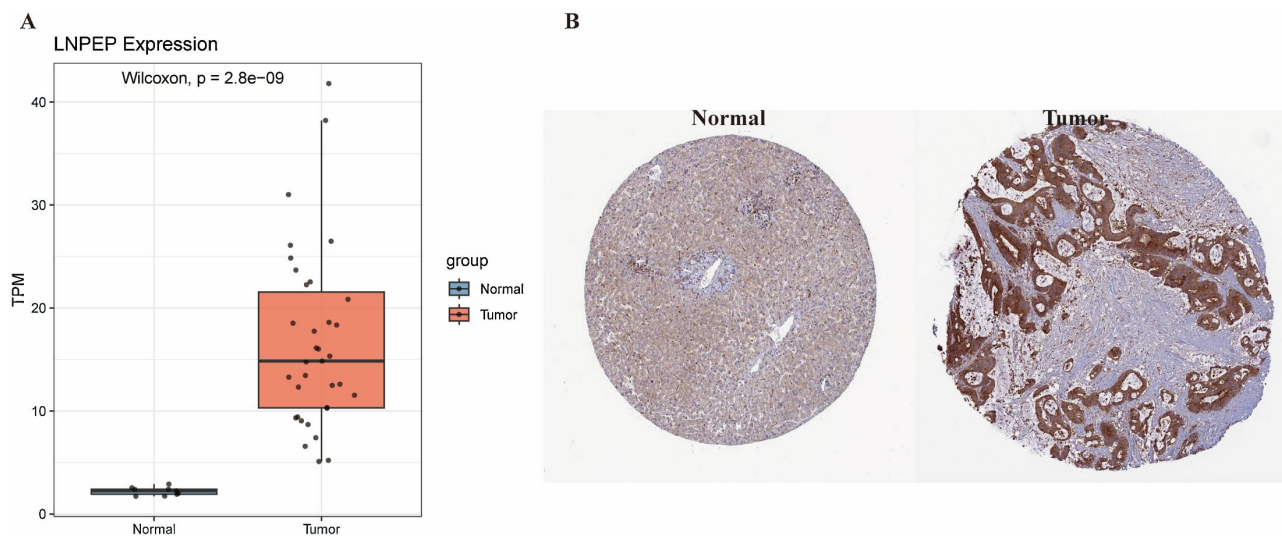
Figure 2. Single-cell atlas construction and malignant cell identification in cholangiocarcinoma
图 2. 胆管癌单细胞图谱构建与恶性细胞鉴定



(A) 使用 CopyKAT 算法鉴定非整倍体和二倍体细胞。(B) 差异表达分析,发现 LNPEP 和 TNFAIP8 在单细胞水平显著上调。

Figure 3. Identification of malignant epithelial cells using CopyKAT

图 3. CopyKAT 鉴定恶性上皮细胞



(A) TCGA-CHOL 队列转录组数据分析显示, LNPEP 在肿瘤组织中的表达水平显著高于癌旁正常组织。(B) HPA 免疫组化 (IHC)染色图像分析。

Figure 4. Validation of LNPEP expression

图 4. LNPEP 表达验证

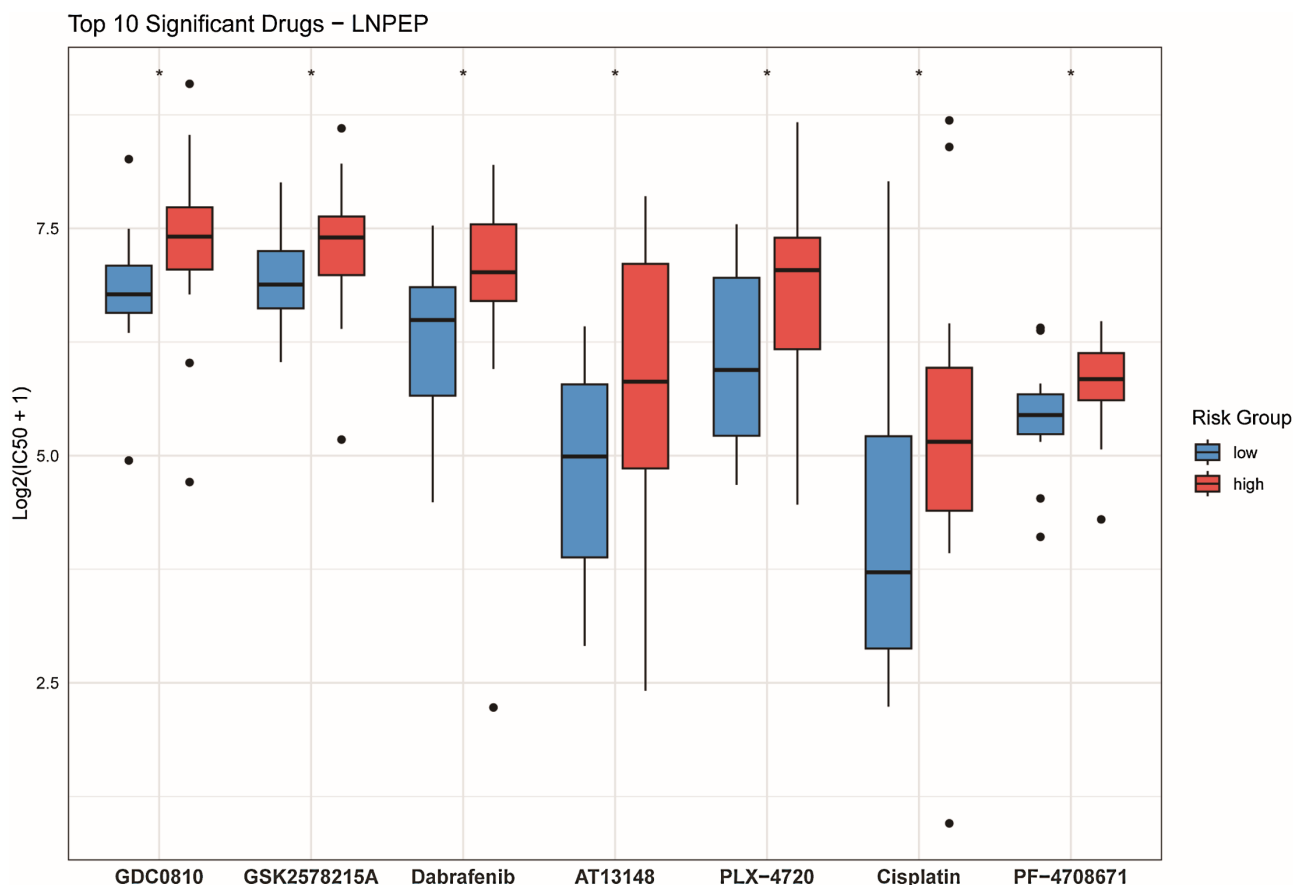


Figure 5. Validation of cisplatin resistance associated with LNPEP in the TCGA-CHOL cohort

图 5. LNPEP 在 TCGA-CHOL 队列中顺铂耐药验证

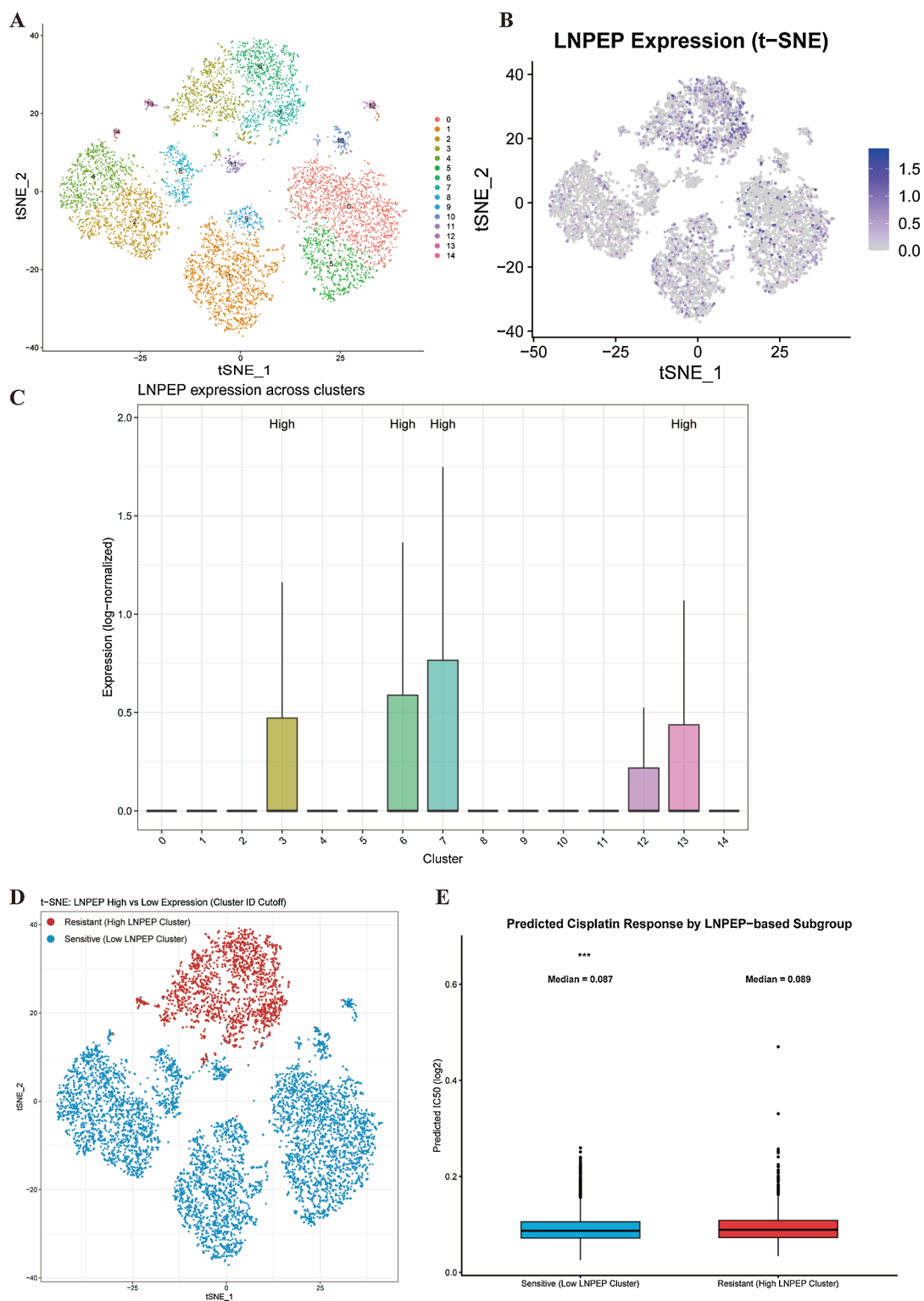
不表达的簇定义为“LNPEP 相关的顺铂敏感样亚群(CCA-S)” (图 6(D))。

为了验证上述基于 LNPEP 分组的顺铂耐药性,我们采用药物敏感性预测对 CCA-R 和 CCA-S 亚群的耐药特征进行了评估。结果显示,CCA-R 亚群的预测 IC₅₀ 显著高于 CCA-S 亚群(图 6(E))。

3.4.4. 细胞通讯分析揭示 LNPEP 相关耐药亚群的生存微环境

CellChat 分析显示,与 CCA-S 相比,CCA-R 在细胞通讯网络中表现出更高的总体信号输入和输出强度(图 7(A)),提示 LNPEP 相关耐药样恶性亚群处于更活跃的通讯状态,既更强地感受肿瘤微环境信号,也可能更显著地参与微环境重塑。在耐药相关通讯通路中,CCA-R 相较于 CCA-S 显示出更强的 ECM/黏附相关信号,尤其是 COLLAGEN、LAMININ、FN1 和 SPP1 等通路;与此同时,MIF 及部分生长因子相关信号也呈增强趋势(图 7(B)),提示 CCA-R 的耐药样状态可能与基质重塑、炎症支持及促存活微环境线索有关。

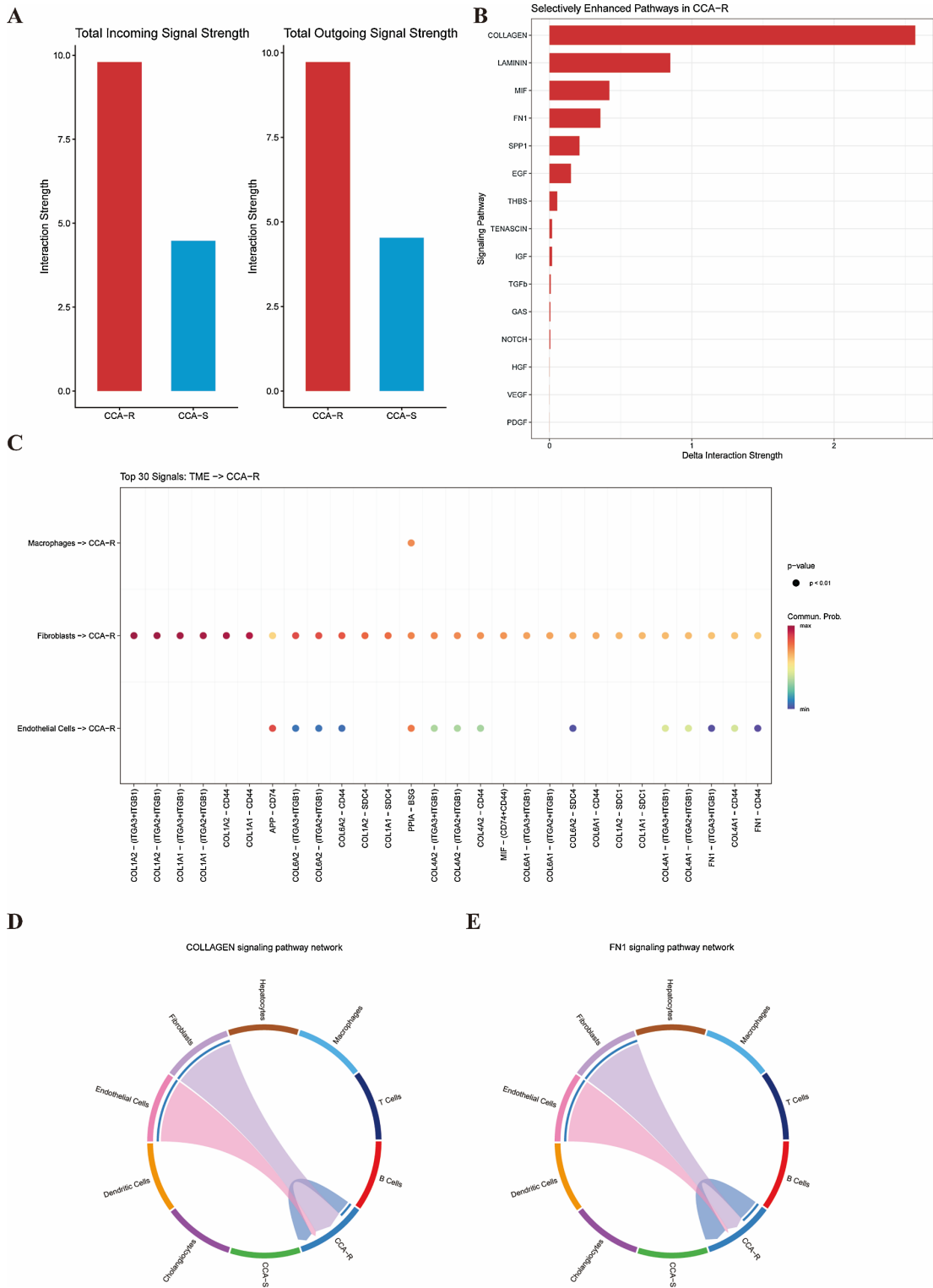
为进一步追踪 CCA-R 的主要微环境信号来源,我们比较了 TME 细胞指向 CCA-R 的高强度配体-受体相互作用(图 7(C))。结果显示,作用于 CCA-R 的主要信号来源于成纤维细胞,其次为内皮细胞。增强的相互作用主要集中于 ECM-受体轴,包括多种胶原分子及 FN1 与整合素受体、CD44 和 syndecan 的相互作用,提示 CCA-R 可能受到基质支持型微环境的持续驱动。聚焦网络图进一步显示(图 7(D)、图 7(E)),COLLAGEN、FN1 相关信号主要由基质细胞发出并汇聚至 CCA-R,进一步支持基质支持型微环境在 LNPEP 相关耐药样状态维持中的作用。



(A) 通过降维与聚类分析, 恶性胆管癌细胞被划分为 15 个精细亚群(Clusters 0~14)。(B) LNPEP 在胆管癌细胞中的表达情况。(C-D) 根据 LNPEP 的表达强度与广度, 识别出高表达的细胞簇 3、6、7 和 13 为 LNPEP 相关的顺铂耐药样亚群(CCA-R)。(E) 基于 LNPEP 分组的顺铂耐药性验证, CCA-R 亚群的预测 IC50 显著高于 CCA-S 亚群。

Figure 6. Analysis of drug resistance heterogeneity in cholangiocarcinoma cells

图 6. 胆管癌细胞耐药异质性分析



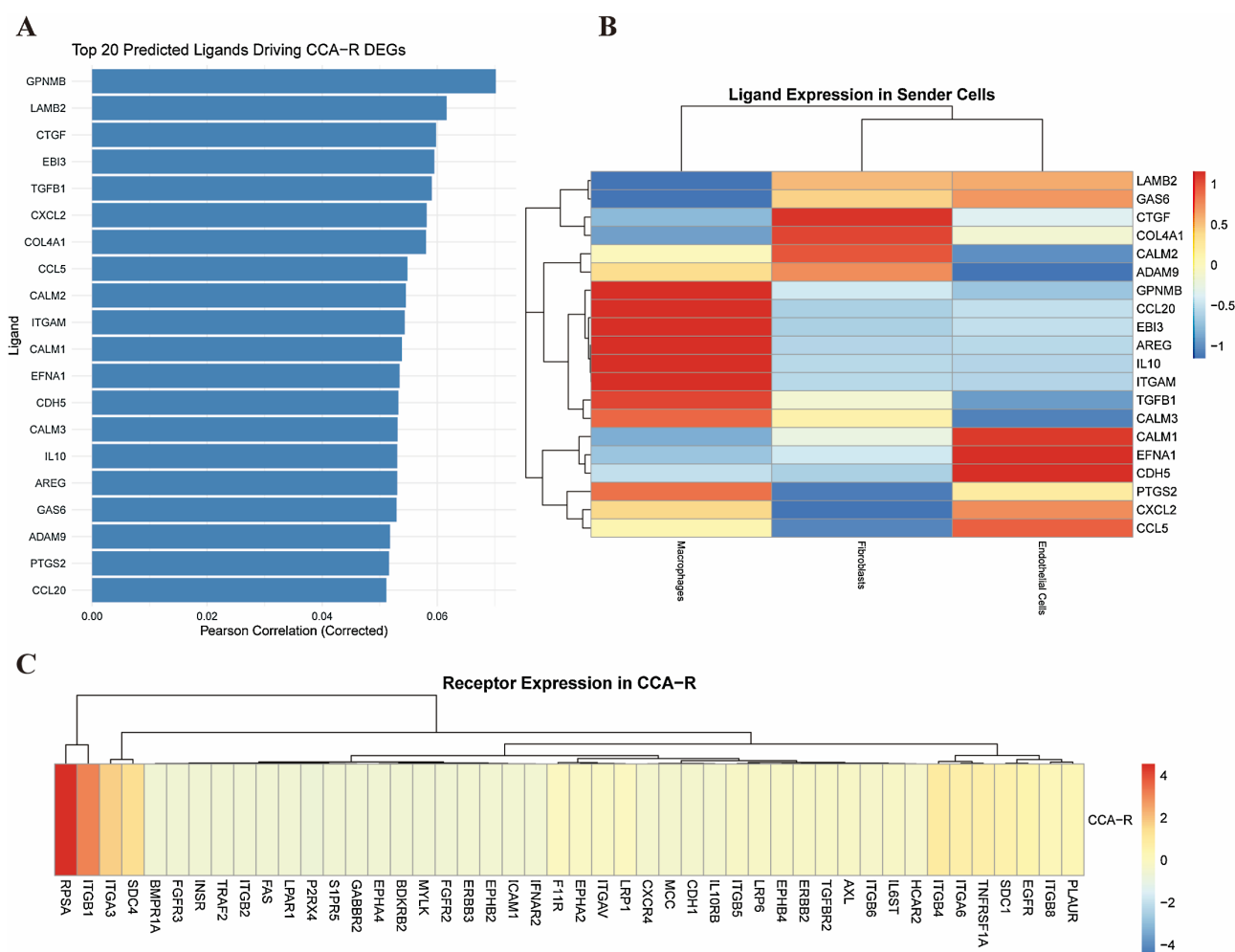
(A) CCA-R 在细胞通讯网络中的信号输入输出强度高于 CCA-S。(B) CCA-R 显示更强 COLLAGEN、LAMININ、FN1、MIF 等信号。(C) 配体 - 受体相互作用分析表明, 成纤维细胞和内皮细胞是主要信号来源。(D) COLLAGEN 信号聚焦网络图。(E) FN1 信号聚焦网络图。

Figure 7. Cell-cell communication analysis between CCA-R and CCA-S
图 7. CCA-R 与 CCA-S 的细胞通讯分析

3.4.5. NicheNet 分析揭示驱动 CCA-R 耐药表型的上游调控网络

为从转录调控层面进一步验证肿瘤微环境对 CCA-R 的支持作用, 在 CellChat 识别出的主要信号发送细胞群(成纤维细胞、巨噬细胞和内皮细胞)基础上, 本研究进一步采用 NicheNet 预测可能驱动 CCA-R 转录程序的上游配体。结果显示, 活性评分靠前的候选配体包括 CCL20、PTGS2、ADAM9、GAS6、AREG、IL10、COL4A1、TGFB1、CTGF、LAMB2 和 GPNMB 等(图 8(A)), 提示炎症相关因子、细胞外基质分子及生长因子样信号可能共同参与 CCA-R 状态的维持。

进一步的配体表达热图显示(图 8(B)), 这些候选配体在不同的信号发送细胞中呈现明显的细胞类型特异性表达模式。其中, 巨噬细胞主要表达 CCL20、EBI3、AREG、IL10 和 TGFB1; 成纤维细胞 preferentially 表达 CTGF、COL4A1 和 GAS6; 而内皮细胞则相对高表达 EFNA1、CDH5、CXCL2、CCL5 和 LAMB2。上述结果提示, 不同类型的微环境细胞可能通过部分不同但具有互补性的配体程序协同作用于 CCA-R。受体表达热图表明(图 8(C)), CCA-R 高表达多种与上述候选配体相对应的受体分子, 包括 ITGB1、ITGA3、SDC4、BMPRI1A、FGFR3、AXL、EGFR、PLAUR、ITGB8 和 SDC1 等, 说明其具备响应微环境来源信号的分子基础。



(A) NicheNet 分析显示的前 20 个活性配体。(B) 配体表达热图。(C) 受体表达热图。

Figure 8. NicheNet analysis reveals upstream regulatory networks driving the resistant phenotype of CCA-R

图 8. NicheNet 分析揭示驱动 CCA-R 耐药表型的上游调控网络

综上, NicheNet 分析表明: 成纤维细胞、巨噬细胞和内皮细胞可通过炎症相关、基质相关及生长因子样配体信号, 共同作用于表达相应受体的 CCA-R, 从而维持其与 LNPEP 相关的耐药样状态。

4. 结论

本研究结合 TCGA 转录组与单细胞 RNA 测序数据, 系统解析了胆管癌铂类耐药相关的分子特征及其微环境调控机制。我们构建并验证了由 BRCA1、CDH1、LNPEP、MNAT1、PDK1 和 TNFAIP8 组成的铂类耐药相关预后模型, 显示出较好的生存预测能力。在单细胞层面, 进一步鉴定出 LNPEP 在恶性胆管癌细胞中持续高表达, 并锁定了 LNPEP 高表达的耐药亚群。该亚群不仅表现出更强的顺铂耐受特征, 还与成纤维细胞、巨噬细胞和内皮细胞形成活跃的通讯网络, 其耐药表型可能依赖于 ECM 重塑、炎症因子及生长因子相关信号的共同维持。上述结果表明, LNPEP 是胆管癌铂类耐药的重要相关分子, 并可能在耐药微环境的形成与维持中发挥关键作用。本研究从单细胞异质性与肿瘤微环境互作角度揭示了胆管癌铂类耐药的潜在机制, 为患者预后分层和耐药预测提供了新的分子依据。以 LNPEP 为代表的耐药相关分子, 可能成为胆管癌精准治疗和联合干预的潜在靶点。

5. 讨论

本研究基于 TCGA 转录组数据和单细胞 RNA 测序数据, 系统解析了胆管癌铂类耐药相关的分子特征及其微环境调控机制。我们首先构建了由 6 个铂类耐药相关基因组成的预后模型, 显示出较好的生存预测效能; 随后在单细胞层面进一步识别出 LNPEP 高表达的恶性耐药亚群, 并发现其与成纤维细胞、巨噬细胞和内皮细胞之间存在增强的细胞通讯。进一步结合 NicheNet 分析提示, 炎症相关、细胞外基质相关及生长因子样信号可能共同参与该耐药亚群转录状态的维持。上述结果提示, 胆管癌铂类耐药并非仅由肿瘤细胞内在分子异常驱动, 还与肿瘤微环境的持续支持密切相关。

既往研究表明 LNPEP 在卵巢癌中具有预后意义[8], 同时还与免疫浸润水平、免疫调节通路紧密相关, 这提示 LNPEP 可能通过调控肿瘤微环境参与肿瘤进展和免疫状态重塑。该结果与本研究在胆管癌中观察到的现象具有一致性, 即 LNPEP 高表达耐药亚群往往伴随更活跃的细胞间通讯及更显著的微环境互作特征。结合本研究结果, LNPEP 可能作为一种与耐药状态相关的分子标志物或候选调控因子, 参与胆管癌恶性细胞对外界信号的响应及适应过程。

肿瘤微环境包含多种非肿瘤细胞成分, 包括成纤维细胞、免疫细胞和内皮细胞等, 这些细胞通过配体-受体互作、基质重塑和炎症信号通路共同塑造肿瘤细胞的行为和药物响应[9][10]。本研究的 CellChat 和 NicheNet 分析揭示了 LNPEP 高表达的耐药亚群与肿瘤微环境细胞之间存在丰富的配体-受体通讯, 其中 ECM/黏附相关信号(如 COL 和 FN1)及炎症和生长因子类信号均显著富集。肿瘤相关成纤维细胞(CAF)和肿瘤相关巨噬细胞(TAM)能够通过分泌基质因子、趋化因子及免疫调节分子重塑肿瘤微环境, 并通过激活整合素、受体酪氨酸激酶等信号通路促进肿瘤细胞存活、迁移和治疗耐受[11][12]。LNPEP 作为氨肽酶类分子, 因其在蛋白质及肽段加工中的潜在功能, 可能协调局部肿瘤微环境中信号分子的降解或激活, 从而调节细胞间信号传递的强度和持续性。换言之, LNPEP 不仅可能作为微环境中信息传递的“读出器”, 还可能通过对肽类信号分子(例如趋化因子、基质片段或促炎细胞因子)的加工调控, 间接影响免疫细胞浸润、炎症状态和肿瘤基质的动态重构。

此外, 肿瘤微环境中的免疫状态重塑在肿瘤进展和耐药形成中发挥重要作用[13]。例如, 低效能的抗肿瘤免疫及免疫抑制性细胞群的积累常与疗效下降和耐药性相关[1][14]。研究显示, 某些微环境-衍生的信号分子(如 TGFB1、IL10 等)能够增强 Treg 的免疫抑制作用, 促进免疫逃逸[15]。本研究中 NicheNet 推断出的候选配体恰好包含此类因子, 表明 LNPEP 相关耐药亚群可能处于一种受微环境免疫信号持续影

响的状态。因此, LNPEP 的高表达不仅可能标记耐药性细胞状态, 还可能成为肿瘤微环境与肿瘤细胞双向调控的重要枢纽, 从而在免疫状态逐渐由肿瘤抑制性向促存活性转化的过程中发挥作用。

尽管本研究从 bulk 转录组、单细胞异质性及细胞通讯多个层面揭示了胆管癌铂类耐药的潜在机制, 但仍存在一定局限。首先, 本研究主要基于公共数据库进行回顾性分析, 样本量相对有限, 结果的普适性仍需在独立临床队列中进一步验证。其次, 药物敏感性结论主要来源于计算模型预测, 尚缺乏体外药敏实验及临床治疗反应数据支持。再次, 本研究仅从转录水平提示 LNPEP 与耐药表型及微环境互作相关, 尚未直接评估其酶活性, 也未明确其关键底物及下游机制。因此, LNPEP 在铂类耐药中的具体作用及相关微环境调控机制, 仍需通过细胞、类器官及动物模型进一步验证。未来可结合基因操作、催化失活突变体回补、酶活检测及底物组学分析等, 系统阐明其酶学与非酶学功能及相关耐药通路, 并进一步解析其相关耐药调控通路, 以期为胆管癌铂类耐药的精准干预提供新的理论依据和潜在靶点。

参考文献

- [1] Law, A.M.K., Valdes-Mora, F. and Gallego-Ortega, D. (2020) Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells*, **9**, Article No. 561. <https://doi.org/10.3390/cells9030561>
- [2] Dhanasekaran, R., Hemming, A.W., Zendejas, I., George, T., Nelson, D.R., Soldevila-Pico, C., *et al.* (2013) Treatment Outcomes and Prognostic Factors of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Oncology Reports*, **29**, 1259-1267. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2290>
- [3] Benson, A.B., D'Angelica, M.I., Abrams, T.A., Are, C., Bloomston, P.M., Chang, D.T., *et al.* (2014) Hepatobiliary Cancers, Version 2.2014. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, **12**, 1152-1182. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2014.0112>
- [4] Dasari, S. and Bernard Tchounwou, P. (2014) Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action. *European Journal of Pharmacology*, **740**, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- [5] Li, H., Yang, P., Wang, J., Zhang, J., Ma, Q., Jiang, Y., *et al.* (2022) HLF Regulates Ferroptosis, Development and Chemoresistance of Triple-Negative Breast Cancer by Activating Tumor Cell-Macrophage Crosstalk. *Journal of Hematology & Oncology*, **15**, Article No. 2. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01223-x>
- [6] Cheng, H., Hsieh, C., Lin, P., Chen, Y., Hsu, D.S., Tai, S., *et al.* (2022) Snail-Regulated Exosomal microRNA-21 Suppresses NLRP3 Inflammasome Activity to Enhance Cisplatin Resistance. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **10**, e004832. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004832>
- [7] Li, K., Lin, H., Liu, A., Qiu, C., Rao, Z., Wang, Z., *et al.* (2024) SOD1-High Fibroblasts Derived Exosomal miR-3960 Promotes Cisplatin Resistance in Triple-Negative Breast Cancer by Suppressing BRSK2-Mediated Phosphorylation of PIMREG. *Cancer Letters*, **590**, Article ID: 216842. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216842>
- [8] Ma, Q., Chang, L., Wang, W., Che, L., Song, X., Li, G., *et al.* (2023) Leucyl and Cystinyl Aminopeptidase as a Prognostic-Related Biomarker in OV Correlating with Immune Infiltrates. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, **16**, 551-568. <https://doi.org/10.2147/pgpm.s400145>
- [9] Zhang, W., Wang, M., Ji, C., Liu, X., Gu, B. and Dong, T. (2024) Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment: Emerging Roles and Therapeutic Potentials. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **177**, Article ID: 116930. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116930>
- [10] de Visser, K.E. and Joyce, J.A. (2023) The Evolving Tumor Microenvironment: From Cancer Initiation to Metastatic Outgrowth. *Cancer Cell*, **41**, 374-403. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
- [11] Hu, Q., Remsing Rix, L.L., Desai, B., Miroshnychenko, D., Li, X., Welsh, E.A., *et al.* (2025) Cancer-Associated Fibroblasts Confer ALK Inhibitor Resistance in *eml4-Alk*-Driven Lung Cancer by Concurrent Integrin and MET Signaling. *Science Signaling*, **18**, eads7662. <https://doi.org/10.1126/scisignal.ads7662>
- [12] Xu, S., Xu, H., Wang, W., Li, S., Li, H., Li, T., *et al.* (2019) The Role of Collagen in Cancer: From Bench to Bedside. *Journal of Translational Medicine*, **17**, Article No. 309. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1>
- [13] Chen, J., Huang, Z., Chen, Y., Tian, H., Chai, P., Shen, Y., *et al.* (2025) Lactate and Lactylation in Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **10**, Article No. 38. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02082-x>
- [14] Lyu, A., Fan, Z., Clark, M., Lea, A., Luong, D., Setayesh, A., *et al.* (2025) Evolution of Myeloid-Mediated Immunotherapy Resistance in Prostate Cancer. *Nature*, **637**, 1207-1217. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08290-3>
- [15] Gu, X., Yang, J., Lai, R., Zhou, Z., Tang, D., Hu, L., *et al.* (2025) Impact of Lactate on Immune Cell Function in the Tumor Microenvironment: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Immunology*, **16**, Article ID: 1563303. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1563303>